

## Quantifying multiple fluorochromes in a sample comprises mathematical analysis of fluorescence data spectrally resolved by using different excitation wavelengths

Patent Number: DE19915137

Publication date: 2000-10-19

Inventor(s): SCHAEFER MICHAEL (DE)

Applicant(s): SCHAEFER MICHAEL (DE)

Requested Patent: DE19915137

Application Number: DE19991015137 19990326

Priority Number(s): DE19991015137 19990326

IPC Classification: G01N21/64

EC Classification: G01N21/64F

Equivalents:

---

### Abstract

---

Quantifying multiple fluorochromes in a sample by recording and storing spectrally resolved fluorescence data for the fluorochromes in pure form and in the sample and determining the contributions from the pure fluorochromes to the complex total signals by multivariate linear regression analysis, spectral resolution by using different excitation wavelengths, is new.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2





⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑯ ⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑯ ⑯ **DE 199 15 137 A 1**

⑯ Int. Cl. 7:  
**G 01 N 21/64**

**DE 199 15 137 A 1**

⑯ Aktenzeichen: 199 15 137.7  
⑯ Anmeldetag: 26. 3. 1999  
⑯ Offenlegungstag: 19. 10. 2000

⑯ Anmelder:  
Schäfer, Michael, 10551 Berlin, DE

⑯ Erfinder:  
gleich Anmelder

⑯ Entgegenhaltungen:

DE	197 18 016 A1
DE	195 33 092 A1
DE	195 08 366 A1
DE 69	218 53 6T2
US	55 04 337 A
US	47 91 310
EP	02 94 524 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren zur Quantifizierung mehrerer Fluorochrome

⑯ Das Verfahren zur Quantifizierung mehrerer Fluorochrome dient der quantitativen Erfassung des Beitrags verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zu einem Gesamtignal, das sich aus den Signalen mehrerer Fluorochrome zusammensetzt. Bei unzureichend durch optische Vorrichtungen abgrenzbaren Fluoreszenzeigenschaften stellt die Quantifizierung des Beitrags der Einzelkomponenten zu komplex zusammengesetzten Gesamtsignalen ein entscheidendes Problem unter anderem in der Fluoreszenzmikroskopie, der DNA-Sequenzierung oder der Werkstoffkunde dar. Diese Erfindung beschreibt ein neues Verfahren, das eine genaue Quantifizierung multipler Fluorochrome durch Aufzeichnung spektral aufgelöster Datensätze mit nachfolgender Regressionsanalyse erzielt. Das beschriebene Verfahren ist in der Lage, unter Erhalt von Bild- und Zeitauflösung den Beitrag verschiedener Fluoreszenzen zu einem komplexen Gesamtignal zurückzuverfolgen. Da keine nachfolgenden Kalibrationsprozeduren erforderlich sind, kann das Verfahren zur Echtzeitanalyse eines komplex zusammengesetzten Signals angewendet werden. Die Nutzung des beschriebenen Verfahrens wird durch Anwendungsbeispiele im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie verdeutlicht.

**DE 199 15 137 A 1**

# DE 199 15 137 A 1

## Datenerfassung der spektral aufgetrennten Fluoreszenzen der Reinformen

Im ersten Schritt werden spektral aufgetrennte Fluoreszenzsignale der in einer Probe vorkommenden Fluorochrome in Reinform sowie das Hintergrundsignal ohne Fluorochrom im gegebenen optischen System aufgezeichnet. Die genannte spektrale Auf trennung wird entweder durch Änderung der Fluoreszenzanregungswellenlängen oder durch spektrale Selektion des in den Detektor gelangenden Fluoreszenzemissionslichts oder durch eine Kombination von beiden Maßnahmen erzielt. Die spektrale Auf trennung kann hierbei kontinuierlich beispielsweise mit Hilfe von Monochromatoren erfolgen oder diskontinuierlich gestaltet werden, beispielsweise durch diskrete Monochromatoreinstellungen, dichroische Spiegel, Filtersätze oder verschiedene Lichtquellen. Die spektral aufgelösten Datensätze werden nach Subtraktion des Hintergrundsignals in einer Datenbank zur späteren Verwendung gespeichert. Die gespeicherten, spektralen Datensätze Hintergrundsignals können bei guter Reproduzierbarkeit in den Datenbanken verbleiben und für spätere Messungen wieder verwendet werden. Die spektral aufgetrennten Datensätze der Reinformen weiterer Fluorochrome können die Datenbank ergänzen und zu den bereits gespeicherten Datensätzen hinzugefügt werden. Die spektral aufgetrennten Datensätze der Reinformen auch bei mehr spektralen Konfigurationen aufgezeichnet werden, als es bei der Messung der Probe zunächst vorgesehen ist. Dies bietet den Vorteil, daß bei späterer Verwendung anderer spektraler Konfigurationen bereits Reference data der Reinformen in der Datenbank existieren, und somit die Reinformfluoreszenzen nicht erneut aufgezeichnet werden müssen.

### Datenerfassung der Fluoreszenzen der Probe

Die Fluoreszenz der Probe setzt sich aus den Fluoreszenzen der genannten Reinformen zusammen. Eine spektrale Auf trennung der Fluoreszenzen der Probe wird in den spektralen und optischen Konfigurationen durchgeführt, in denen auch Daten der Reinformen aufgezeichnet wurden. Vorrhmlich kommen solche spektrale Konfigurationen zum Einsatz, bei denen die Fluoreszenzen der in der Probe vorhandenen Reinformen die größten Differenzen untereinander aufweisen. Eventuell in der Probe vorhandene Autofluoreszenzen werden von den gewonnenen, spektral aufgetrennten Datensätzen subtrahiert.

Die Aufzeichnung der spektral getrennten Datensätze der Probe kann gegebenenfalls wiederholt werden um entweder dynamische Prozesse in der Probe zu verfolgen oder durch Mittelwertbildung die Streuung des Meßsignals zu verrin-

### Datenanalyse

Die gespeicherten Daten werden im folgenden Schritt mit Hilfe einer Regressionsanalyse ausgewertet. Hierbei können multivariate lineare Regressionsanalysen oder nichtlineare Regressionsanalysen zum Einsatz kommen. Im vorliegenden Anwendungsbeispiel wurden Auswertungen mit beiden Verfahren durchgeführt. Vor- und Nachteile der entsprechenden Verfahren werden erläutert. Durch die Regressionsanalyse können die relativen Beiträge der Reinformen zum Gesamt signal ermittelt werden und bei Kenntnis der Signalintensität bekannter Mengen des Fluorochroms auf die in der Probe vorhandene Menge des Fluorochroms geschlossen werden. Die hierzu erforderlichen Schritte werden in der Folge beschrieben:

Da CCD-Kameras bis zur Sättigungsschwelle weitgehend linear arbeiten, kann angenommen werden, daß sich unterhalb der Sättigungsschwelle bei jeder spektralen Konfiguration  $i$  das Gesamt signal einer Probe  $F_{ges}$  additiv aus den Signalanteilen der Einzelkomponenten  $1, 2, \dots, m$  zusammensetzt. Daher gilt  $F_{ges} = F_1 + F_2 + \dots + F_m$ . Diese Einzelkomponenten können als Produkt der durch Aufzeichnung und Normierung der Reinformfluoreszenzen bekannten, normierten Fluoreszenzintensitäten  $x_1, x_2, \dots, x_m$  mit den unbekannten Skalierungsfaktoren  $b_1, b_2, \dots, b_m$  ausgedrückt werden:  $F_m = b_m x_m$ . Während die normierten Fluoreszenzintensitäten  $x$  jeder der Einzelkomponenten bei unterschiedlichen spektralen Konfigurationen verschieden sind, bleiben die Skalierungsfaktoren  $b$ , die die in der Probe vorhandenen Stoffmengen der Fluorochrome anzeigen, konstant. Falls das für die Aufzeichnung eines spektralen Datensatzes benötigte Zeitintervall bei dynamischen Prozessen nicht vernachlässigbar gering ist, können sich Fehlerquellen ergeben; daher ist bei kinetischen Untersuchungen auf einen geschwindigkeitsoptimierten Ablauf der Datenerfassung zu achten.

Das Verfahren der Regressionsanalyse wird nur auf die Datensätze angewendet, um den Betrag der unbekannten Skalierungsfaktoren  $b_1 \dots b_m$  der jeweiligen normierten Intensität der Reinformen  $x_1 \dots x_m$  zum Gesamt signal  $y$  zu ermitteln. Bei jeder spektralen Konfiguration  $i$  setzt sich das Gesamt signal  $y_i$  aus den Signalen der im Bildelement befindlichen Reinformen  $F_{im}$  bzw.  $b_{im} x_{im}$  additiv zusammen.

Für jede Wellenlänge  $i$  gilt somit:

$$\text{Formel (1)} \quad y_i = b_1 x_{i1} + b_2 x_{i2} + b_3 x_{i3} + \dots + b_m x_{im}.$$

Die Anzahl der Reinformen  $m$  bestimmt die Zahl  $n$  der spektral unterschiedlichen Datensätze, die mindestens aufgezeichnet werden müssen, um eine Lösung mit Hilfe der Regressionsanalyse zu erzielen. Allgemein gilt also  $n \geq m$ .

Durch Aufzeichnen der  $n$  verschiedenen Datensätze ergeben sich aus den gemessenen spektral verschiedenen Datensätzen  $n$  verschiedene Lösungen eines linearen Gleichungssystems (LGS).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5 Formel (2):

$$\left\{ \begin{array}{l} y_1 = b_1 x_{11} + b_2 x_{12} + b_3 x_{13} + \dots + b_m x_{1m} \\ y_2 = b_1 x_{21} + b_2 x_{22} + b_3 x_{23} + \dots + b_m x_{2m} \\ \vdots \quad \vdots \quad \vdots \quad \vdots \\ y_n = b_1 x_{n1} + b_2 x_{n2} + b_3 x_{n3} + \dots + b_m x_{nm} \end{array} \right\}$$

10

Dieses LGS kann bei der Aufzeichnung von m verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, deren spektrales Verhalten bekannt ist ( $x_{11} \dots x_{nm}$  sind bekannt) bei  $n = m$  Wellenlängen direkt durch das Gauss-Jordan sche Eliminationsverfahren gelöst werden, falls zwischen den n verschiedenen Lösungen keine lineare Abhängigkeiten bestehen. Die multivariate lineare Regressionsanalyse besitzt jedoch den Vorteil, daß mehr Meßwerte in die Berechnung aufgenommen werden können, und daß das Berechnungsverfahren zuverlässiger gestaltet werden kann.

15

Bei steigender Anzahl n erhöht sich die Zuverlässigkeit der Regressionsanalyse besonders bei nur schwach spektral unterschiedlichen Fluorochromen. Andererseits werden die Datensätze umfangreicher und die Datenanalyse verlangsamt. Bei der im Anwendungsbeispiel verwendeten CCD-Kamera mit 12 bit Auflösung werden beispielsweise bis zu  $1,3 \times 10^6$  Bildpunkte aufgezeichnet. Dies entspricht bei jeweils 10 verschiedenen spektralen Konfigurationen zu 20 Zeitintervallen einem Datensatz von 520 Megabyte.

20

Bei vektorieller Beschreibung einer multivariaten linearen Regressionsanalyse können die gesuchten Beträge der Reinformen in einem Lösungsvektor  $\bar{b}$  wie folgt ausgedrückt werden:  $\bar{b} = A^{-1} \times \bar{z}$ , wobei  $A^{-1}$  die inverse einer Matrix A ist. Der gesamte Term lautet:

25

$$\text{Formel (3)} \quad \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ \vdots \\ b_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sum x_{11} x_{11} & \sum x_{11} x_{12} & \sum x_{11} x_{13} & \dots & \sum x_{11} x_{1m} \\ \sum x_{12} x_{11} & \sum x_{12} x_{12} & \sum x_{12} x_{13} & \dots & \sum x_{12} x_{1m} \\ \sum x_{13} x_{11} & \sum x_{13} x_{12} & \sum x_{13} x_{13} & \dots & \sum x_{13} x_{1m} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \sum x_{1m} x_{11} & \sum x_{1m} x_{12} & \sum x_{1m} x_{13} & \dots & \sum x_{1m} x_{1m} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} \sum x_{11} y_1 \\ \sum x_{12} y_1 \\ \sum x_{13} y_1 \\ \vdots \\ \sum x_{1m} y_1 \end{pmatrix}$$

30

Die Summen  $\Sigma$  werden hierbei über alle gemessenen spektralen Konfigurationen  $i = 1$  bis  $1 = n$  gebildet. Da die Matrix A quadratisch ist, kann die Inverse der Matrix  $A^{-1}$  durch das Gauß'sche Eliminationsverfahren mit Rücksubstitution gebildet werden. Bei hoher Komplexität der Matrix und bei schwach divergenten Datensätzen muß besonders auf Rundungsfehler geachtet werden, die sich teilweise dramatisch auswirken können. Die Computergestützte Ermittlung der inversen Matrix wurde daher im Anwendungsbeispiel mit doppelt genauen Fließkommavariablen durchgeführt. Im Zweifelsfall kann ein iteratives Verfahren zur Kontrolle und Verbesserung der Bildung der inversen Matrix dienen. Da die inverse Matrix für ein Meßprotokoll lediglich ein Mal berechnet werden muß, ist das aufwendige Verfahren der iterativen Kontrolle und Verbesserung empfehlenswert. Entsprechende Algorithmen mit Programmierungsroutinen sind der Fachliteratur zu entnehmen und im Internet publiziert.

35

Nach Kalkulation der inversen Matrix  $A^{-1}$  können mit Hilfe einiger Multiplikations- und Additionsschritte die Matrix  $A^{-1}$  mit dem Vektor  $z$  zur Ermittlung des Lösungsvektors  $\bar{b}$  ausmultipliziert werden. In den Zeilen des Lösungsvektors sind die relativen Beträge des Beitrags der einzelnen Fluorochrome zum jeweiligen Gesamtignal enthalten. Diese können bei homogener Ausleuchtung des Gesichtsfeldes über das gesamte Bildfeld als Maß für die lokale Menge des jeweiligen Fluorochroms dienen. Bei inhomogener Ausleuchtung können Korrekturfaktoren angewendet werden, die zuvor durch Messung einer normierten Fluorochromkonzentration in verschiedenen Bereichen des Gesichtsfeldes ermittelt wurden. Bei Fluoreszenzindikatoren, die abhängig von Milieubedingungen ihre Eigenschaften ändern (z. B. Fura-2 und Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Komplex), ist zur Rückrechnung der entsprechenden Milieubedingung (lokale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration) keine Korrektur erforderlich, da Unterschiede in der Fluoreszenzintensität beide Indikatorformen gleichermaßen betreffen. So kann im Fall des Fluoreszenzindikators Fura-2 die lokale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch folgende Formel berechnet werden:

40

$$\text{Formel (4)} \quad [\text{Ca}^{2+}] = K_D \times [\text{Fura-2-Ca}^{2+}] / [\text{Fura-2}]$$

45

#### Alternative Datenanalyseverfahren

50

Alternativ zum beschriebenen multivariaten linearen Regressionsverfahren wurden nichtlineare Regressionsverfahren geprüft. Die Berechnung der relativen Anteile der Einzelkomponenten zum Gesamtignal wird durch ein Minimierungsverfahren der Abweichungsquadrate zwischen Meßwerten der Probe und einer Summierung der mit den gesuchten Faktoren multiplizierten normierten Meßdaten der Reinformen (Formel (1)) erzielt. Die Summe der Abweichungsquadrate kann mittels verschiedener iterativer Verfahren minimiert werden. Vergleichend wurden die "steepest gradient" Methode und der Levenberg-Marquardt-Algorithmus für die iterative Berechnung angewendet. Beide Verfahren ergeben unter Berücksichtigung äquivalenter Abbruchkriterien der iterativen Optimierung identische Lösungen. Bei geeigneter Wahl von Startwerten für die iterativ zu ermittelnden Faktoren  $b_1 \dots b_m$  ist das nichtlineare Regressionsverfahren zuverlässig und bietet eine einfache Handhabung. Falls die Startwerte und die initialen Schrittweiten des iterativen Verfahrens ungünstig definiert wurden, ergeben sich jedoch falsch konditionierte Iterationsschritte, die eine Fehlbestimmung in Form eines lokalen Minimums der Minimierungsfunktion ergeben können. Diese Gefahr kann zwar durch die Definition von Grenz-

# DE 199 15 137 A 1

werten für  $b_1 \dots b_m$  reduziert werden, doch gerade bei Minimierungsfunktionen mit komplexer Topologie ist die Zuverlässigkeit der iterativen Suche des globalen Minimums eingeschränkt.

Das multivariate lineare Regressionsverfahren bietet somit gegenüber dem nichtlinearen Regressionsverfahren für die Mehrzahl der Applikationen folgende Vorteile:

- nichtlineare Regressionsverfahren bergen das Risiko, ein lokales Optimum der Datenanpassung zu finden, das multivariate lineare Regressionsverfahren erfaßt immer das globale Optimum der Datenanpassung
- Der Berechnungsaufwand durch das multivariate lineare Verfahren ist wesentlich niedriger als bei den iterativen Verfahren und bei einer gegebenen Konfiguration immer identisch. Somit ist die benötigte Rechenzeit abschätzbar und dadurch die Integrierbarkeit in Echtzeit-Programmabläufe gegeben.
- Die Berechnungsschritte der Matrixoperation (Formel (3)) bestehen lediglich in Additionen und Multiplikationen. Daher kann für die Anwendung des Verfahrens der hohe Grad der Rechenoptimierung in aktuellen Prozessoren ("pipelining" von Additionen und Multiplikationen) ideal genutzt werden. Alternativ können jedoch auch Prozessoren mit reduziertem Befehlssatz ("RISC"-Prozessoren) verwendet werden.

5

10

15

## Anwendungsbeispiel

Die Vorrichtung, die bei Erstellung des Anwendungsbeispiels verwendet wurde, ist in Zeichnung 1 schematisch wiedergegeben. Das in einem Monochromator (T.I.L.L.-Photonics) erzeugte Anregungslicht wurde durch eine schnelle Steuervorrichtung auf verschiedene Wellenlängen eingestellt. Durch die Wahl der Ruheposition des Monochromators bei einer von der Optik nicht transmittierten Wellenlänge von 260 nm diente die schnelle Monochromatorsteuerung gleichzeitig zur Steuerung der Belichtungszeit der CCD-Kamera. Andernfalls muß durch eine gepulste Lichtquelle oder durch einen mechanischen oder elektronischen Verschluß im Strahlengang die Belichtungszeit des Sensors reguliert werden. Das Anregungslicht kann bei Verwendung nicht-monochromatischer Lichtquellen durch geeignete Bandpassfilter gefiltert werden. Hier können zur Aufzeichnung spektraler Datensätze beispielweise Filterräder zum Einsatz kommen, die synchron zu dem Verschluß der CCD-Kamera gesteuert werden. Die dichroischen Spiegel, die bei herkömmlichen Epifluoreszenzmikroskopen verwendet werden, können ebenfalls zur spektralen Auftrennung gewechselt werden. Hierbei ist jedoch auf einen möglichen Pixelversatz des Bildsignals nach Wechsel der Spiegel und Filtersätze zu achten, der durch die Bauweise der Spiegel und Filter bedingt sein kann. Das Objektiv muß über eine hinreichende Bildebene und eine geringe chromatische Aberration verfügen. Das im Anwendungsbeispiel angewandte Objektiv ist ein UV-optimierter, lichtstarker Achromat (Fluar 10x/0.50, Carl Zeiss AG), dessen Bildebene im Meßfeld der verwendeten CCD-Kamera eine hohe Bildschärfe in den verwendeten spektralen Bereichen erzeugte. Das emittierte Licht wurde zur Elimination von Streulicht durch einen Langpassfilter (Transmission bei  $\lambda > 510$  nm) geleitet, bevor es in den Sensor gelangte. Die verwendete CCD-Kamera zeichnet sich durch einen "grade-0"-Chip ohne Pixeldefekte aus, der zur Verringerung des Dunkelstromes durch Peltier-Elemente auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt wird. Bei Verwendung anderer Sensoren muß beachtet werden, daß das Regressionsverfahren auf der Grundlage der Formel (1) nur dann angewendet werden kann, wenn der Sensor in einem linearen Arbeitsbereich betrieben wird. Gegebenenfalls können bei einem bekanntem, nichtlinearen Verhalten des Sensors entsprechende Umrechnungsfaktoren bei der Datenerfassung angewendet werden, um die tatsächliche Signalintensität der Probe zu erfassen und nach dem beschriebenen Verfahren fortzusetzen.

In Fig. 2 sind spektral aufgelöste Datensätze der Anregungswellenlängen von 320 nm bis 490 nm in 1 nm-Schritten von Fura-2, Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Komplex und "green fluorescent protein" (GFP) nach Normierung auf die maximale Fluoreszenzintensität des entsprechenden Fluorochroms abgebildet. Als Reinformen wurden in der Fokusebene folgende Materialien gemessen:

20

25

30

35

40

45

50

55

60

1. GFP: In HEK 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen), die rekombinantes modifiziertes GFP exprimieren (48 Stunden nach transienter Transfektion des Plasmids pEGFP-C1, Clontech, Palo Alto, CA, USA).
2. Fura-2: In HEK 293-Zellen, die mit Fura-2-Azetoxymethylester (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) geladen wurden, und mit dem Ca<sup>2+</sup>-Chelator Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure 2 mM (EGTA; Fluka, Deisenhofen, Deutschland) und dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin 5  $\mu\text{M}$  (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für 2 h inkubiert wurden.
3. Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Komplex: In HEK 293-Zellen, die mit Fura-2-Azetoxymethylester (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) geladen wurden und mit Ca<sup>2+</sup> 10 mM und dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin 5  $\mu\text{M}$  (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für 20 min inkubiert wurden.
4. Zusätzlich zu Punkt 2 und 3 wurde eine 2  $\mu\text{M}$  Lösung von Fura-2-Kaliumsalz in einer Pufferlösung (pH 7,1) in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> bzw. EGTA in der Probenkammer gemessen. Die Daten dieser Messungen ergaben gegenüber den Messungen nach Punkt 2 und Punkt 3 weniger als 1 nm spektrale Verschiebungen und bestätigen dadurch die Effizienz der Aquilibrierungsprozedur in HEK 293-Zellen. Da diese normierten Anregungsspektren mit den nach Punkt 2 bzw. Punkt 3 ermittelten Spektren nahezu übereinstimmen, wurden sie aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in Zeichnung 2 abgebildet.

Als Probe wurden im selben optischen System HEK 293-Zellen gemessen, die gleichzeitig mit pEGFP-C1 und der cDNA eines Kationenkanals (mTRPC4) im Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen, USA) transient transzisiert wurden. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz und die Auswahl der positiv transzistierten Zellen für den Melivorgang konnte durch die Expression des GFP erfolgen. Der Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fura-2 wurde verwendet, da er Mangan (Mn<sup>2+</sup>) unter Ausbildung eines nicht-fluoreszierenden Komplex bindet (Grynkiewicz et al. (1985)). Da der Kationenkanal mTRPC4 neben Ca<sup>2+</sup> auch Manganionen (Mn<sup>2+</sup>) leitet, kann in Mn<sup>2+</sup>-haltigen Medien die Kanalaktivität durch das Absinken der Fura-2- und Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Fluoreszenz verfolgt werden. Hierbei wäre zu erwarten, daß die Fluoreszenz beider

65

# DE 199 15 137 A 1

Fura-2-Indikator spezies absinkt, nicht jedoch die Fluoreszenz des GFP. Da große Intensitätsunterschiede der Fluoreszenzen der drei in der Probe vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffspezies im Bereich von 340 nm, 358 nm, 380 nm und 480 nm große Differenzen untereinander aufweisen, wurden diese Anregungswellenlängen für den Meßvorgang ausgewählt. Durch die Wahl der Expositionszeit der CCD-Kamera von 30 ms bei jeder Anregungswellenlänge wurde der dynamische Bereich der CCD-Kamera optimal genutzt, wobei insbesondere darauf geachtet wurde, daß keine Bildpixel die Sättigungsschwelle der CCD-Kamera übersteigen. Die Aufzeichnung eines spektralen Datensatzes erforderte weniger als 200 ms und wurde in 1 s Intervallen wiederholt.

Bildregionen, die einzelnen Zellen entsprechen, wurden selektiert und eine Zeitserie der mittleren Bildpixelwerte über jede der selektierten Bildregionen berechnet. Die entsprechenden Mittelwerte der Bildregionen bei den Wellenlängen 340 nm, 358 nm, 380 nm und 480 nm sind als Funktion der Zeit in den Fig. 3-6 dargestellt. Bei 20 s wurde  $Mn^{2+}$  1 mM zugegeben, um die Kanalaktivität zu verfolgen, nach 90 s wurden die Zellen mit Carbachol 100  $\mu M$  stimuliert. Durch das beschriebene multivariate, lineare Regressionsverfahren wurden nun die relativen Beträge der einzelnen Fluorochrome, die sich zum jeweiligen Gesamt signal addieren, für jede Zelle zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Zugrundegelegt wurden hierbei die normierten spektral aufgetrennten Fluoreszenzintensitäten der Reinformen aus Fig. 2. Nach Verrechnung der relativen Fura-2 und Fura-2- $Ca^{2+}$  Konzentrationen gemäß der Formel (4) wurde die resultierende freie zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration in den selektierten Bildarealen (entsprechend mehreren verschiedenen Zellen im Gesichtsfeld) im oberen Abbildungsteil der Fig. 7 ((1) in Fig. 7) als Funktion der Zeit aufgetragen. Die durch das multivariaten, linearen Regressionsverfahrens ermittelten Zeitverläufe der Summe der relativen Fura-2 und Fura-2- $Ca^{2+}$  Fluoreszenzen wurden summiert und nach Normierung auf die initialen Fluoreszenzintensitäten im mittleren Abbildungsteil der Fig. 7 ((2) in Fig. 7) dargestellt. Die relative GFP-Konzentration ist im unteren Abbildungsteil der Fig. 7 ((3) in Fig. 7) aufgetragen. Aus Abbildungsteil (2) in Fig. 7 kann man ersehen, daß die Stimulation eines  $Mn^{2+}$ -Einstromes zu einer rapiden Verringerung der Fura-2- und Fura-2- $Ca^{2+}$ -Signale führt. Die durch das genannte Verfahren ermittelte GFP-Fluoreszenz ((3) in Fig. 7) hingegen bleibt nahezu konstant. Weiterhin ist eine Bestimmung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration selbst unter mehreren Stör einflüssen möglich ((1) in Fig. 7). So wurden im Anwendungsbeispiel mehrere Störgrößen eingeführt, die jeweils eine Quantifizierung durch das von Grynkiewicz et al. (1985) beschriebene "Ratio-Verfahren" beeinträchtigen würden:

- Die Anwesenheit eines dritten Fluorochroms (GFP) verursacht in den Anregungswellenlängen 380 nm, 358 nm und 340 nm unterschiedlich starke Signalintensitäten, die die Fluoreszenzsignale von Fura-2 überlagern.
- Die deutliche Abnahme der Fura-Fluoreszenzen nach Auslösung eines  $Mn^{2+}$ -Einstromes in die Zellen führt zu inkonsistenten Ergebnissen nach dem "Ratio-Verfahren".
- Durch Abnahme der Fura-Fluoreszenzen nimmt die Störgröße der GFP-Fluoreszenz zeitabhängig im Verhältnis zu den Fura-Fluoreszenzen zu.

Da mit dem in dieser Erfindung beschriebenen Verfahren die Fluorochromzusammensetzung ohne die Bildung von "Ratio-Verfahren" ermittelt werden kann, nehmen die Störgrößen keinen Einfluß auf die Quantifizierung der örtlich und zeitlich aufgelösten Fluorochromzusammensetzung. Fluorochrome mit deutlich überlappenden spektralen Eigenschaften können somit erstmals ohne die Verwendung von "Ratio-Verfahren" zuverlässig quantifiziert werden.

## Beispiele der bevorzugten Nutzungsmöglichkeiten der Erfindung

Die Schnelligkeit des Berechnungsverfahrens erlaubt es, eine hohe zeitliche und/oder räumliche Auflösung der Meßvorrichtung unvermindert zu nutzen. Durch weitere Entwicklungen in Hard- und Software werden durch online-Berechnungen die im Speicher verbreitbenden Datensätze weiter reduziert werden können, da nach dem Berechnungsverfahren die spektral aufgelösten Bilddaten nicht mehr benötigt werden. Eine online-Berechnung der Datensätze würde neben der Speicherplatzreduktion den weiteren Vorteil bieten, daß bereits kalibrierte Daten visualisiert werden können. Der Anwender könnte auf dem Bildschirm beispielsweise simultan und nahezu in Echtzeit die bereits kalibrierte  $Ca^{2+}$ -Konzentration, den pH-Wert in einer Zelle oder die Lokalisation verschiedener fluoreszierender Proteine und Farbstoffe während eines laufenden Experiments beobachten. In einem Fluoreszenzmikroskop können nach Angabe der in der Probe enthaltenen Fluorochrome durch Echtzeit-Berechnungen verschiedene Fluorochrome in getrennten Bildern oder durch Farbkodierungen kenntlich gemacht nebeneinander oder in übereinander gelagerten Bildern dargestellt werden. Dies ist bei Verwendungen von Fluorochromen, die durch opische Vorrichtungen quantitativ unterscheidbar sind, in der konfokalen Lasermikroskopie und in der mehr-Phoronen-Mikroskopie bereits verwirklicht worden. Bei Verwendung von Indikatorfarbstoffen können jedoch lediglich relative Veränderungen beobachtet werden; eine Quantifizierung könnte mit dem in dieser Erfindung beschriebenen Verfahren ermöglicht werden.

Vorrichtungen, die durch ihre Eignung zur Aufzeichnung spektraler Datensätze für die Anwendungen des in dieser Erfindung beschriebenen Verfahrens besonders geeignet erscheinen, sind beschrieben worden. Sie umfassen konfokale und nicht-konfokale Fluoreszenzmikroskope (US 5751417, US 5861984, US 5864139, WO 9222793), aber auch die Fluoreszenz-gestützte Durchflusszytometrie (in Patent US 4745285 bereits mit den technischen Voraussetzungen für eine spektrale Auftrennung der Fluoreszenzemission beschrieben) oder die Fluoreszenz-basierte DNA-Sequenzierung (EP 0294524 und dessen Weiterentwicklungen). Die Kalibration der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Mikroskopie (z. B. WO 9855026) kann ebenfalls durch das erfindungsgemäße Verfahren bedeutend erleichtert werden. Die Fluoreszenzen des "green fluorescent protein" (GFP) und seiner Varianten (US 5777079, WO 9821355, EP 0851874, US 5741668, WO 9742320, CA 2232727, WO 9726333, AU 4482996, US 55625048, WO 9711094, WO 9623810, WO 9521191) können mit dem erfindungsgemäßen spektroskopischen Quantifizierungsverfahren trotz überlappender spektraler Eigenschaften effektiv voneinander separiert werden. Dies ermöglicht erstmals die simultane Bestimmung mehrerer Expressionsmarker in vitalen Zellen. Durch die Expression von Fusionsproteinen mit den genannten GFP-Varianten können verschiedene zelluläre Proteine simultan in lebenden Zellen beobachtet werden. Kolokalisationsstudien

# DE 199 15 137 A 1

mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET) können mit dem in dieser Erfindung vorgestellten Verfahren durch die exakte Quantifizierung der Einzelfluoreszenzen mit bedeutend größerem Auflösungsvermögen durchgeführt werden.

Literaturnachweis:

1. Brismar H., Ulthake B., Fluorescence lifetime measurements in confocal microscopy of neurons labeled with multiple Fluorophores; Nat. Biotechnol. 1997; 15: 373-377; 5
2. Carlsson K., Aslund N., Mossberg K., Philip J., Simultaneous confocal recording of multiple fluorescent labels with improved channel separation, J. Microsc. 1994; 176: 287-299;
3. Carlsson K., Liljeborg A., Simultaneous confocal lifetime imaging of multiple fluorophores using the intensity-modulated multiple-wavelength scanning (IMS) technique; J. Microsc. 1998; 191: 119-127; 10
4. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y., A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties; J. Biol. Chem. 1985; 260: 3440-3450;
5. He H., Nunnally B. K., Li L. C., McGowen L. B., On-the-fly fluorescence lifetime detection of dye-labeled DNA primers for multiplex analysis; Anal Chem. 1998; 70: 3413-3418;
6. Lowy R. J., Evaluation of triple-band filters for quantitative epifluorescence microscopy; J. Microsc. 1995; 15: 178: 240-250;
7. Oida T., Sako Y., Kusumi A., Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells, Biophys. J. 1993; 64: 676-685;
8. Ried T., Baldini A., Rand T. C., Ward D. C., Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992; 20 89: 1388-1392.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Quantifizierung mehrerer Fluorochrome, bei dem durch Aufzeichnung und Speicherung spektral aufgetrennter Fluoreszenzen der in einer Probe enthaltenen Fluorochrome in Reinform, durch die Aufzeichnung und Speicherung spektral aufgetrennter Fluoreszenzen der Probe und durch die Anwendung eines multivariaten, linearen Regressionsverfahrens die Beiträge der Reinformen zu komplexen Gesamtsignalen ermittelt werden, dadurch gekennzeichnet, dass eine spektrale Auftrennung durch die Verwendung verschiedener Anregungswellenlängen erfolgt. 25
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine spektrale Auftrennung oder Filterung des emittierten Lichtes bei einer Anregungswellenlänge zur Erfassung spektral aufgetrennter Fluoreszenzen eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine spektrale Auftrennung oder Filterung des emittierten Lichtes bei mehreren verschiedenen Anregungswellenlängen zur Erfassung spektral aufgetrennter Fluoreszenzen eingesetzt wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein nichtlineares Regressionsverfahren zur Berechnung der Beiträge der Reinformen zu komplexen Gesamtsignalen verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß bei Verwendung von m verschiedenen Fluorochromen  $n = m$  verschiedene spektrale Konfigurationen zur Datenaufzeichnung eingesetzt werden, und ein Substitutionsverfahren zur Berechnung der Beiträge der Reinformen zu komplexen Gesamtsignalen verwendet wird. 40
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Anregungslichtquellen kontinuierliche oder gepulste Laserlichtquellen verwendet werden.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Quantifizierungen von Milieubedingungen durchgeführt werden, wobei ein oder mehrere Fluoreszenzindikator(en) eingesetzt werden, deren millieuabhängig veränderliche Formen für das erfundungsgemäße Quantifizierungsverfahren als verschiedene Reinformen von Fluorochromen behandelt werden können.
8. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in der Fluoreszenzmikroskopie.
9. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1, 2, 3, 4 und 6 in der Nukleinsäuresequenzierung.
10. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in der Durchfluszytometrie oder dem "fluorescence-assisted-cell-sorting" (FACS). 45
11. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in der Fluoreszenzspektrophotometrie oder der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. 50

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

## Optical arrangement for selection and detection of the spectral region of a light beam and confocal scanning microscope

Patent Number:  US2002021440  
Publication date: 2002-02-21  
Inventor(s): KNEBEL WERNER (DE)  
Applicant(s):  
Requested Patent:  DE10038049  
Application Number: US20010682187 20010802  
Priority Number(s): DE20001038049 20000802  
IPC Classification: G01J3/06  
EC Classification:  
Equivalents:  EP1178345, JP2002122787

---

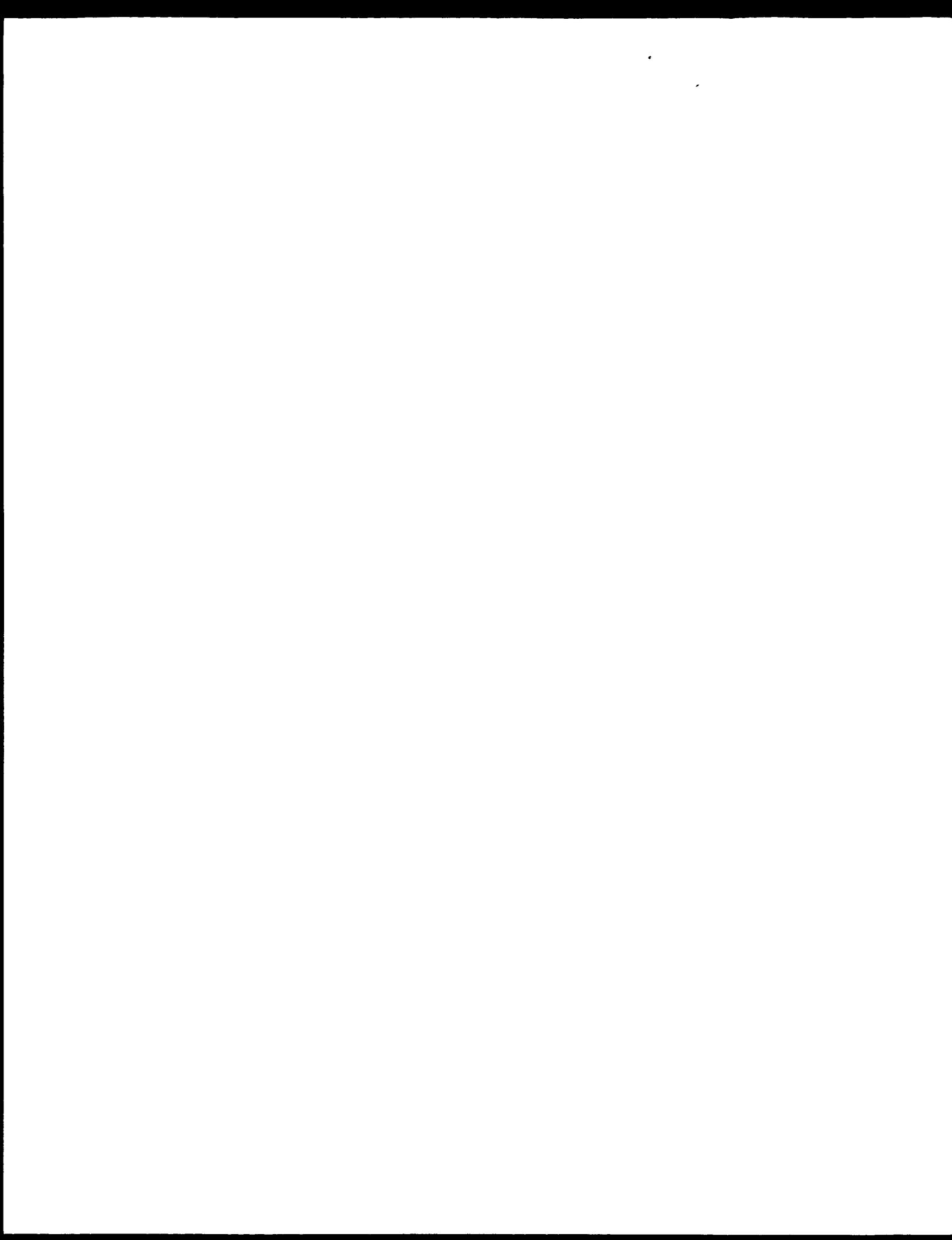
### Abstract

---

The present invention concerns an optical arrangement for selection and detection of the spectral region of a light beam (1) in a confocal scanning microscope, having a means (2) for spectral dispersion of the light beam (1), having means (3) for selecting a definable spectral region (4), and having a detection apparatus (5). The optical arrangement should be able to scan or detect multiple narrow-band spectral regions of a spectral region to be detected, in as uninterrupted a fashion as possible and in variably adjustable steps

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2





19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 38 049 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 J 3/36**  
G 01 N 21/25

71 Anmelder:  
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 68165  
Mannheim, DE

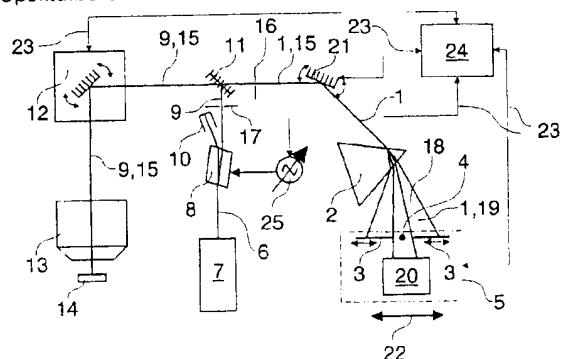
74 Vertreter:  
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

72) Erfinder:

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

② Optische Anordnung zur Selektion und Detektion des Spektralbereichs eines Lichtstrahls

54) Optische Anordnung zur Selektion und Detektion eines Lichtstrahls  
55) Die vorliegende Erfindung betrifft eine optische Anordnung zur Selektion und Detektion des Spektralbereichs eines Lichtstrahls (1) in einem konfokalen Rastermikroskop, mit einem Mittel (2) zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls (1), mit Mitteln (3) zum Selektieren eines vorgebaren spektralen Bereichs (4) und mit einer Detektionsvorrichtung (5). Die optische Anordnung sollte von einem zu detektierenden spektralen Bereich mehrere schmalbandige spektrale Bereiche möglichst lückenlos und in variabel einstellbaren Schritten abtasten bzw. detektieren können. Weiterhin sollte eine schnelle und variable spektrale Detektion möglich sein, die gleichzeitig kostengünstig realisierbar ist. Die erfindungsgemäße optische Anordnung ist dadurch gekennzeichnet, dass zur Beeinflussung des zu detektierenden spektralen Bereichs (4, 18) der spektral zergliederte Lichtstrahl (19) und die Detektionsvorrichtung (5) relativ zueinander in ihrer Position veränderbar sind.



DE 100 38 049 A 1

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine optische Anordnung zur Selektion und Detektion des Lichts eines Spektralbereichs eines Lichtstrahls in einem konfokalen Rastermikroskop, mit einem Mittel zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls, mit Mitteln zum Selektieren eines vorgebaren spektralen Bereichs und mit einer Detektionsvorrichtung.

[0002] Anordnungen der gattungsbildenden Art sind aus der DE 43 30 347 und der DE 199 02 625 bekannt. Diese Anordnungen werden vorzugsweise im Strahlengang konfokaler Laserscanning-Mikroskope eingesetzt. Hierbei wird ein das Detektionspinhole passierender Lichtstrahl mit einem Mittel zur spektralen Zerlegung spektral aufgefächert. Ein Teil des spektral aufgefächerten Lichtstrahls kann dann eine erste variabel angeordnete Spiegelblendenanordnung passieren. Der entsprechende spektrale Bereich wird dann von einem Detektor detektiert. Der Anteil des aufgefächerten Lichtstrahls, der auf die erste Spiegelblendenanordnung auft trifft, wird an ihr zu einer weiteren Spiegelblendenanordnung reflektiert. Auch an der weiteren Spiegelblendenanordnung kann ein Teil des an der ersten Spiegelblendenanordnung reflektierten spektral aufgefächerten Lichtstrahls passieren, der mit einem weiteren Detektor detektiert wird. Der verbleibende Teil wird mit der weiteren Spiegelblendenanordnung zu einem dritten Detektor reflektiert, dem gegebenenfalls eine weitere Spiegelblendenanordnung vorgeordnet ist.

[0003] Die bekannten optischen Anordnungen verwenden zur Detektion verschiedener Spektralbereiche mehrere Detektionskanäle. Jeder Detektionskanal ist üblicherweise mit einem eigenen Detektor ausgerüstet, was mit zum Teil erheblichen Kosten verbunden ist. Mit den bekannten optischen Anordnungen ist es ferner möglich, simultan mehrere Spektralbereiche zu detektieren, jedoch ist eine Detektion zahlreicher schmalbandiger Spektralbereiche mit den bekannten Anordnungen simultan nicht ohne weiteres möglich. Insbesondere wenn der gesamte Spektralbereich von beispielsweise 500 nm bis 800 nm in 5 nm-Schritten zu detektieren ist, ist eine mechanische Verstellung der variabel angeordneten Spiegelblenden erforderlich, was relativ viel Zeit in Anspruch nimmt.

[0004] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine optische Anordnung der gattungsbildenden Art anzugeben und weiterzubilden, die von einem zu detektierenden spektralen Bereich mehrere schmalbandige spektrale Bereiche möglichst lückenlos und in variabel einstellbaren Schritten abtasten bzw. detektieren kann. Weiterhin sollte eine schnelle und variable spektrale Detektion möglich sein, die gleichzeitig kostengünstig realisierbar ist.

[0005] Das erfundungsgemäße Verfahren der gattungsbildenden Art löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist eine solche Anordnung dadurch gekennzeichnet, dass zur Beeinflussung des zu detektierenden spektralen Bereichs der spektral zerlegte Lichtstrahl und die Detektionsvorrichtung relativ zueinander in ihrer Position veränderbar sind.

[0006] Erfundungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass eine schnelle und variable spektrale Detektion durch eine relative Positionsänderung erzielt werden kann, und zwar ohne jedesmal mindestens eine Spiegelblende mechanisch zu bewegen. Durch diese relative Positionsänderung ist es in vorteilhafter Weise möglich, den spektralen Detektionsbereich sehr viel schneller einzustellen, als das mit einer Spektralbereichsänderung durch die Mittel zum Selektieren des vorgebaren Bereichs möglich ist, wodurch die Detektionszeit reduziert wird. Beispielsweise ist es insbe-

sondere bei der Selektion eines schmalbandigen spektralen Detektionsbereichs von 5 nm möglich, aufgrund der relativen Positionsänderung einen ausgedehnten Spektralbereich mit diesem eingestellten schmalbandigen Spektralbereich in 5 Schritten von je 5 nm zu detektieren.

[0007] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Detektionsvorrichtung nur einen Detektor. Bei diesem Detektor könnte es sich beispielsweise um einen Photomultiplier handeln, die Verwendung einer Photodiode, insbesondere einer Avalanche-Photodiode, wäre ebenfalls denkbar. Aufgrund der relativen Positionsänderung des spektral zerlegten Lichtstrahls und der Detektionsvorrichtung kann in vorteilhafter Weise auf den Einsatz mehrerer Detektoren verzichtet werden, was die Herstellungskosten ganz erheblich reduziert. Letztendlich werden nicht nur zwei, drei oder vier Detektoren eingespart, sondern auch deren zum Teil aufwendige Stromversorgung sowie Auslesevorrichtungen mit der entsprechenden Peripherie. Darüber hinaus entfällt des Weiteren die komplizierte räumliche Anordnung mehrerer Detektoren samt deren Mittel zum Selektieren des vorgebaren spektralen Bereichs, so dass in weiterer vorteilhafter Weise die Produktion erheblich vereinfacht wird.

[0008] Die erfundungsgemäße relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung bewirkt eine Veränderung der Anfangs- und/oder Endwellenlänge des spektral selektierten Bereichs. Wenn beispielsweise der spektral zerlegte Lichtstrahl relativ zur Detektionsvorrichtung lateral verschoben wird, so "sieht" der Detektor nach dieser Verschiebung einen spektralen Bereich, der eine andere Anfangs- und Endwellenlänge aufweist. Wenn die Dispersionseigenschaft des Mittels zur spektralen Zerlegung kleiner ist, bleibt in diesem Beispiel die Breite des zu detektierenden spektralen Bereichs unverändert, da die Lage der Mittel zum Selektieren des vorgebaren spektralen Bereichs relativ zum Detektor nicht verändert wurden. Es gibt nun mehrere Möglichkeiten, die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung durchzuführen.

[0009] In einer ersten Ausführungsform wird zur relativen Positionsänderung mindestens ein im Strahlengang angeordnetes optisches Bauteil gedreht oder verschoben. Bei dem optischen Bauteil handelt es sich vorzugsweise um einen Spiegel. Das Drehen eines im optischen Strahlengang angeordneten Spiegels könnte das zu detektierende Lichtbündel in der Pupille einer das Lichtbündel kollimierenden Linse verkippen. Der sich drehende Spiegel müsste im Detektionsstrahlengang der kollimierenden Linse vorgeordnet sein. Das gedrehte oder verschobene optische Bauteil ist im Detektionsstrahlengang vor dem Mittel zur spektralen Zerlegung angeordnet. Das Verkippen des Lichtbündels in der Pupille der kollimierenden Linse bewirkt eine laterale Verschiebung des auf die Detektionsvorrichtung auftreffenden spektral zerlegten Lichtstrahls.

[0010] In einer alternativen Ausführungsform erfolgt die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung durch Drehen oder Verschieben des Mittels zur spektralen Zerlegung. Auch hierdurch kann der spektral zerlegte Lichtstrahl relativ zur Detektionsvorrichtung verschoben bzw. verändert werden.

[0011] Das optische Bauteil bzw. das Mittel zur spektralen Zerlegung könnte auch gedreht und verschoben werden. Hierdurch ergibt sich dann – abhängig von der Anordnung der Drehachse und der Ausgestaltung der Verschiebung – eine Verkippung des optischen Bauteils bzw. des Mittels zur spektralen Zerlegung.

[0012] Die Drehung des Mittels zur spektralen Zerlegung

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine optische Anordnung zur Selektion und Detektion des Lichts eines Spektralbereichs eines Lichtstrahls in einem konfokalen Rastermikroskop, mit einem Mittel zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls, mit Mitteln zum Selektieren eines vorgebaren spektralen Bereichs und mit einer Detektionsvorrichtung.

[0002] Anordnungen der gattungsbildenden Art sind aus der DE 43 30 347 und der DE 199 02 625 bekannt. Diese Anordnungen werden vorzugsweise im Strahlengang konfokaler Laserscanning-Mikroskope eingesetzt. Hierbei wird ein das Detektionspinhole passierender Lichtstrahl mit einem Mittel zur spektralen Zerlegung spektral aufgefächert. Ein Teil des spektral aufgefächerten Lichtstrahls kann dann eine erste variabel angeordnete Spiegelblendenanordnung passieren. Der entsprechende spektrale Bereich wird dann von einem Detektor detektiert. Der Anteil des aufgefächerten Lichtstrahls, der auf die erste Spiegelblendenanordnung auftrifft, wird an ihr zu einer weiteren Spiegelblendenanordnung reflektiert. Auch an der weiteren Spiegelblendenanordnung kann ein Teil des an der ersten Spiegelblendenanordnung reflektierten spektral aufgefächerten Lichtstrahls passieren, der mit einem weiteren Detektor detektiert wird. Der verbleibende Teil wird mit der weiteren Spiegelblendenanordnung zu einem dritten Detektor reflektiert, dem gegebenenfalls eine weitere Spiegelblendenanordnung vorgeordnet ist.

[0003] Die bekannten optischen Anordnungen verwenden zur Detektion verschiedener Spektralbereiche mehrere Detektionskanäle. Jeder Detektionskanal ist üblicherweise mit einem eigenen Detektor ausgerüstet, was mit zum Teil erheblichen Kosten verbunden ist. Mit den bekannten optischen Anordnungen ist es ferner möglich, simultan mehrere Spektralbereiche zu detektieren, jedoch ist eine Detektion zahlreicher schmalbandiger Spektralbereiche mit den bekannten Anordnungen simultan nicht ohne weiteres möglich. Insbesondere wenn der gesamte Spektralbereich von beispielsweise 500 nm bis 800 nm in 5 nm-Schritten zu detektieren ist, ist eine mechanische Verstellung der variabel angeordneten Spiegelblenden erforderlich, was relativ viel Zeit in Anspruch nimmt.

[0004] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine optische Anordnung der gattungsbildenden Art anzugeben und weiterzubilden, die von einem zu detektierenden spektralen Bereich mehrere schmalbandige spektrale Bereiche möglichst lückenlos und in variabel einstellbaren Schritten abtasten bzw. detektieren kann. Weiterhin sollte eine schnelle und variable spektrale Detektion möglich sein, die gleichzeitig kostengünstig realisierbar ist.

[0005] Das erfindungsgemäße Verfahren der gattungsbildenden Art löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist eine solche Anordnung dadurch gekennzeichnet, dass zur Beeinflussung des zu detektierenden spektralen Bereichs der spektral zerlegte Lichtstrahl und die Detektionsvorrichtung relativ zueinander in ihrer Position veränderbar sind.

[0006] Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass eine schnelle und variable spektrale Detektion durch eine relative Positionsänderung erzielt werden kann, und zwar ohne jedesmal mindestens eine Spiegelblende mechanisch zu bewegen. Durch diese relative Positionsänderung ist es in vorteilhafter Weise möglich, den spektralen Detektionsbereich sehr viel schneller einzustellen, als das mit einer Spektralbereichsänderung durch die Mittel zum Selektieren des vorgebaren Bereichs möglich ist, wodurch die Detektionszeit reduziert wird. Beispielsweise ist es insbe-

sondere bei der Selektion eines schmalbandigen spektralen Detektionsbereichs von 5 nm möglich, aufgrund der relativ wenigen Positionsänderung einen ausgedehnten Spektralbereich mit diesem eingestellten schmalbandigen Spektralbereich in 5 Schritten von je 5 nm zu detektieren.

[0007] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Detektionsvorrichtung nur einen Detektor. Bei diesem Detektor könnte es sich beispielsweise um einen Photomultipliern handeln, die Verwendung einer Photodiode, insbesondere einer Avalanche-Photodiode, wäre ebenfalls denkbar. Aufgrund der relativen Positionsänderung des spektral zerlegten Lichtstrahls und der Detektionsvorrichtung kann in vorteilhafter Weise auf den Einsatz mehrerer Detektoren verzichtet werden, was die Herstellungskosten ganz erheblich reduziert. Letztendlich werden nicht nur zwei, drei oder vier Detektoren eingespart, sondern auch deren zum Teil aufwendige Stromversorgung sowie Auslesevorrichtungen mit der entsprechenden Peripherie. Darüber hinaus entfällt des Weiteren die komplizierte räumliche Anordnung mehrerer Detektoren samt deren Mittel zum Selektieren des vorgebaren spektralen Bereichs, so dass in weiterer vorteilhafter Weise die Produktion erheblich vereinfacht wird.

[0008] Die erfindungsgemäße relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung bewirkt eine Veränderung der Anfangs- und/oder Endwellenlänge des spektral selektierten Bereichs. Wenn beispielsweise der spektral zerlegte Lichtstrahl relativ zur Detektionsvorrichtung lateral verschoben wird, so "sieht" der Detektor nach dieser Verschiebung einen spektralen Bereich, der eine andere Anfangs- und Endwellenlänge aufweist. Wenn die Dispersionseigenschaft des Mittels zur spektralen Zerlegung kleiner ist, bleibt in diesem Beispiel die Breite des zu detektierenden spektralen Bereichs unverändert, da die Lage der Mittel zum Selektieren des vorgebaren spektralen Bereichs relativ zum Detektor nicht verändert wurden. Es gibt nun mehrere Möglichkeiten, die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung durchzuführen.

[0009] In einer ersten Ausführungsform wird zur relativen Positionsänderung mindestens ein im Strahlengang angeordnetes optisches Bauteil gedreht oder verschoben. Bei dem optischen Bauteil handelt es sich vorzugsweise um einen Spiegel. Das Drehen eines im optischen Strahlengang angeordneten Spiegels könnte das zu detektierende Lichtbündel in der Pupille einer das Lichtbündel kollimierenden Linse verkippen. Der sich drehende Spiegel müsste im Detektionsstrahlengang der kollimierenden Linse vorgeordnet sein. Das gedrehte oder verschobene optische Bauteil ist im Detektionsstrahlengang vor dem Mittel zur spektralen Zerlegung angeordnet. Das Verkippen des Lichtbündels in der Pupille der kollimierenden Linse bewirkt eine laterale Verschiebung des auf die Detektionsvorrichtung auftreffenden spektral zerlegten Lichtstrahls.

[0010] In einer alternativen Ausführungsform erfolgt die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung durch Drehen oder Verschieben des Mittels zur spektralen Zerlegung. Auch hierdurch kann der spektral zerlegte Lichtstrahl relativ zur Detektionsvorrichtung verschoben bzw. verändert werden.

[0011] Das optische Bauteil bzw. das Mittel zur spektralen Zerlegung könnte auch gedreht und verschoben werden. Hierdurch ergibt sich dann – abhängig von der Anordnung der Drehachse und der Ausgestaltung der Verschiebung – eine Verkipfung des optischen Bauteils bzw. des Mittels zur spektralen Zerlegung.

[0012] Die Drehung des Mittels zur spektralen Zerlegung

sowie des obengenannten optischen Bauteils könnte unter Verwendung eines Galvanometers erfolgen. Das zu drehende Bauteil könnte direkt an das Galvanometer gekoppelt sein. Vorzugsweise ist es auf dessen mechanischer Drehachse befestigt. Alternativ hierzu könnte die Drehung der zu drehenden Bauteile durch den Einsatz von Piezoelementen erfolgen. Diese Drehung könnte über einen mechanischen Hebel bewirkt werden, wobei der Hebel beispielsweise relativ zur Drehachse radial verläuft und das Piezoelement zwischen einem ortsfesten Gehäuseteil und dem mechanischen Hebel wirkt. Hierbei ist eine Drehung des Bauteils in die beiden entgegengesetzten Drehrichtungen erforderlich, wobei der mechanische Hebel mit dem Piezoelement derart gekoppelt ist, dass das Piezoelement den Hebel sowohl drücken als auch ziehen kann.

[0013] In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung durch eine Relativbewegung der Detektionsvorrichtung erfolgt. Hierbei kann die Relativbewegung der Detektionsvorrichtung entweder gradlinig oder auf einem Bogen erfolgen. Im Allgemeinen werden die Mittel zum Selektieren des vorgebbaren spektralen Bereichs – also beispielsweise die Spaltblendenanordnung – mitsamt dem Detektor bewegt. Die Detektionsvorrichtung umfasst in diesem Fall die Mittel zum Selektieren des vorgebbaren Bereichs und den Detektor. Falls die Relativbewegung über eine Strecke erfolgt, die kleiner als die nutzbare Ausdehnung des Detektors ist, könnten in vorteilhafter Weise auch lediglich die Mittel zum Selektieren des vorgebbaren spektralen Bereichs bewegt werden.

[0014] In einer besonders vorteilhafter Weise erfolgt die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung durch eine kombinierte Winkel-/Lageänderung mindestens zweier optischer Bauteile. Durch die kombinierte bzw. simultane Positionsänderung, beispielsweise eines sich drehenden Spiegels mit der Relativbewegung der Detektionsvorrichtung, ist eine beschleunigte Detektion bei verändelter spektraler Detektionseinstellung möglich. So könnten kombiniert ein im Strahlengang angeordnetes optisches Bauteil sowie das Mittel zum spektralen Zerlegen und die Detektionsvorrichtung jeweils eine Winkel- und/oder Lageänderung durchführen, wobei die Frequenzen der jeweiligen Winkel-/Lageänderung in fester Beziehung zueinander stehen können. Beispielsweise dreht das zweite Bauteil mit der doppelten Frequenz des ersten Bauteils und die Detektionsvorrichtung wird mit einer dreifachen Frequenz der Drehbewegung des ersten Bauteils bewegt.

[0015] Als Mittel zur spektralen Zerlegung ist ein Prisma, ein Reflexions- oder eine Transmissionsgitter vorgesehen. Die Verwendung eines Prismas zur spektralen Zerlegung hat den Vorteil, dass die Streulichtanteile bei einem Prisma verglichen zu einem Gitter geringer sind, so dass ein Prisma zur spektralen Zerlegung für die erfundungsgemäße Anordnung bevorzugt wird. Ein Reflexions- oder Transmissionsgitter wäre dann zu bevorzugen, wenn die Streulichtanteile detektorseitig eine untergeordnete Rolle spielen, jedoch das Mittel zur spektralen Zerlegung also das Gitter aufgrund der geringeren Masse mit einer hohen Frequenz gedreht bzw. verschoben werden soll.

[0016] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung mit dem Rastervorgang des konfokalen Rastermikroskops synchronisierbar. Hierdurch kann die spektrale Detektion in Abhängigkeit der jeweiligen Rasterposition des konfokalen Rastermikroskops während des Scanvorgangs verändert

werden, wodurch in besonders vorteilhafter Weise für jeden Objektpunkt beispielsweise die spektrale Verteilung des von dem Objektpunkt emittierten Fluoreszenzlichts detektiert werden kann.

[0017] In einer konkreten Ausführungsform ist vorgesehen, dass mit dem konfokalen Rastermikroskop ein Objektausschnitt bei verschiedenen spektralen Detektionseinstellungen wiederholt solange jeweils abgerastert wird, bis der gesamte zu detektierende Spektralbereich detektiert ist. Erst dann wird ein nächster Objektausschnitt abgerastert. Ein Objektausschnitt könnte ein Punkt, eine Linie, eine Gerade, eine Fläche oder ein dreidimensionaler Bereich sein. Beispielsweise könnte eine Linienrasterung derart ausgestaltet sein, dass der spektrale Detektionsbereich eine Breite von 5 nm aufweist. Der für die Detektion insgesamt verfügbare Spektralbereich verläuft von 500 nm bis 800 nm. Der vorliegende spektrale Detektionsbereich wird nun zu Beginn der Linienrasterung derart eingestellt, dass der Detektor den spektralen Bereich von 500 nm bis 505 nm detektiert. Nachdem die abzurasternde Linie das Objekt ein erstes Mal abgerastert hat, wird durch die relative Positionsänderung des spektral zerlegten Lichtstrahls und der Detektionsvorrichtung ein zu detektierender spektraler Bereich von 505 nm bis 510 nm eingestellt, der von dem Detektor detektiert wird. Es ist vorgesehen, dass die gleiche Linie des Objekts so oft abgerastert wird, bis das Detektionslicht des vorgebaren spektralen Bereichs von 5 nm lückenlos bis zu der höchsten zu detektierenden Wellenlänge von 800 nm detektiert wurde. Diese Vorgehensweise ist auch bei einer beliebig ausgeformten oder gekrümmten Linie eines Objekts denkbar. Hinsichtlich der Fläche ist ein Rechteck oder ein beliebig begrenztes zweidimensionales Gebiet vorgesehen.

[0018] Die Synchronisation der relativen Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl und der Detektionsvorrichtung mit dem Rastervorgang des konfokalen Rastermikroskops umfasst in vorteilhafter Weise auch die Wahl der in das Rastermikroskop einzukoppelnden Lichtwellenlänge. Beispielsweise ist es bei der konfokalen Fluoreszenz-Rastermikroskopie denkbar, dass während der oben beschriebenen Linienrasterung passend zu dem jeweils eingestellten spektralen Detektionsbereich Licht der entsprechenden Anregungswellenlänge des für diesen spektralen Detektionsbereich in Frage kommenden Fluoreszenzfarbstoffs in das Rastermikroskop eingekoppelt wird. Die Einkopplung des Lichts der entsprechenden Wellenlänge erfolgt hierbei mit einem akusto-optischen Bauteil, beispielsweise einem AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) oder einem AOBS (Acousto-Optical-Beam-Splitter). Mit einem AOTF bzw. AOBS ist es möglich, Licht einer bestimmten Wellenlänge selektiv in das konfokale Rastermikroskop einzukoppeln, wobei auch Licht mehrerer Wellenlängen simultan einkoppelbar sind und die Lichtleistung des Lichts der jeweiligen Wellenlänge mit dem AOTF bzw. AOBS regelbar ist.

[0019] Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszustalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung des bevorzugten Ausführungsbeispiels der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung des bevorzugten Ausführungsbeispiels der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigt

[0020] Figur eine schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels der erfundungsgemäßen optischen Anordnung.

[0021] Die Figur zeigt eine optische Anordnung zur Selektion und Detektion des Spektralbereichs eines Lichtstrahls 1 in einem konfokalen Rastermikroskop, mit einem Mittel 2 zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls 1, mit Mitteln 3 zum Selektieren eines vorgebaren spektralen Bereichs 4 und mit einer Detektionsvorrichtung 5.

[0022] Bei dem in der Figur gezeigten konfokalen Rastermikroskop wird Laserlicht 6 der Laserlichtquelle 7 mit Hilfe eines AOTF's 8 in den Beleuchtungsstrahlengang 9 des konfokalen Rastermikroskops eingekoppelt. Das nicht eingekoppelte Laserlicht wird von der Strahlfalle 10 absorbiert. Das eingekoppelte Laserlicht 9 wird an dem dichroitischen Strahleiter 11 zur Strahlablenkeinrichtung 12 reflektiert, bei der das Beleuchtungslicht 9 in zwei im wesentlichen senkrecht zueinander stehenden Richtungen abgelenkt wird. Das Beleuchtungslicht durchläuft die Mikroskopoptik 13 und beleuchtet das schematisch gezeichnete Fluoreszenzobjekt 14. Das vom Fluoreszenzobjekt 14 emittierte Fluoreszenzlicht 15 durchläuft den Strahlengang in umgekehrter Reihenfolge bis zum dichroitischen Strahleiter 11.

[0023] Nach dem Passieren des Detektionsportholes 16, das in einer zur Ebene des Anregungsportholes 17 korrespondierenden Fokusebene angeordnet ist, wird das Fluoreszenzlicht 15 bzw. 1 zur weiteren Detektion von der erfundsgemäßen optischen Anordnung weiterverarbeitet.

[0024] Erfundsgemäß sind zur Beeinflussung des zu detektierenden spektralen Bereichs 4, 18 der spektral zerlegte Lichtstrahl 19 und die Detektionsvorrichtung 5 relativ zueinander in ihrer Position veränderbar. Die Detektionsvorrichtung 5 umfasst einen einzigen Detektor 20.

[0025] Die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl 19 und der Detektionsvorrichtung 5 bewirkt eine Veränderung der Anfangs- und/oder Endwellenlänge des spektral selektierten Bereichs 4. Die relative Positionsänderung erfolgt durch Drehen des im Detektionsstrahlengang 15 angeordneten Spiegels 21. Der Spiegel 21 ist vor dem Mittel 2 zur spektralen Zerlegung angeordnet. Die Drehung des Spiegels 21 erfolgt um die senkrecht zur Zeichenebene verlaufende Drehachse 26.

[0026] Zur relativen Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl 19 und der Detektionsvorrichtung 5 ist weiterhin eine Relativbewegung der Detektionsvorrichtung 5 vorgesehen. Die Detektionsvorrichtung 5 wird entlang der Richtung 22 geradlinig bewegt. Somit werden der Detektor 5 und die Mittel 3 zum Selektieren des vorgebaren Bereichs 4 gemeinsam verschoben.

[0027] In diesem Ausführungsbeispiel werden also zwei optische Bauteile, der Spiegel 21 und die Detektionsvorrichtung 5, einer kombinierten Winkel- und Lageänderung unterzogen. Hierbei erfolgt die Bewegung der Detektionsvorrichtung 5 verglichen zur Drehbewegung des Spiegels 21 langsam.

[0028] Zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls 15 dient ein Prisma 2.

[0029] Mit Hilfe den Verbindungen 23 ist die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl 19 und der Detektionsvorrichtung 5 mit dem Rastervorgang des konfokalen Rastermikroskops synchronisierbar. Die aktuelle Position der Strahlablenkeinrichtung 12 wird über die Synchronisationsverbindung 23 dem Steuerrechner 24 des konfokalen Rastermikroskops übergeben, der in Abhängigkeit der aktuellen Strahlposition der Strahlablenkvorrichtung 12 den Spiegel 21 sowie die Detektionsvorrichtung 5 bewegt. Der Steuerrechner 24 des konfokalen Rastermikroskops ist ebenfalls über eine Verbindung 23 mit der Steuervorrichtung 25 des AOTF's 8 verbunden, so dass die Wahl der in das Rastermikroskop einzukoppelnden Lichtwellenlänge ebenfalls synchron zur relativen Positionsänderung

zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl 19 und der Detektionsvorrichtung 5 möglich ist.

[0030] Anschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass das voranstehend erörterte Ausführungsbeispiel lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dient, diese jedoch nicht auf das Ausführungsbeispiel einschränkt.

#### Bezugszeichenliste

- 10 1 Lichtstrahl
- 2 Mittel zur spektralen Zerlegung, Prisma
- 3 Mittel zum Selektieren von (4)
- 4 vorgebbarer spektraler Bereich
- 5 Detektionsvorrichtung
- 15 6 Laserlicht
- 7 Laserlichtquelle
- 8 AOTF
- 9 Beleuchtungsstrahlengang
- 10 Strahlfalle
- 20 11 dichroitischer Strahleiter
- 12 Strahlablenkvorrichtung
- 13 Mikroskopoptik
- 14 Objekt
- 15 Fluoreszenzlicht, Detektionsstrahlengang
- 25 16 Detektionsporthole
- 17 Anregungsporthole
- 18 zu detektierender spektraler Bereich
- 19 spektral zerlegter Lichtstrahl
- 20 Detektor
- 30 21 Spiegel
- 22 Bewegungsrichtung von (5)
- 23 Synchronisationsverbindung zwischen (21) und (24), (12) und (24), (5) und (24), (25) und (24)
- 24 Steuerrechner des konfokalen Rastermikroskops
- 35 25 Steuervorrichtung von (8)
- 26 Drehachse von (21)

#### Patentansprüche

1. Optische Anordnung zur Selektion und Detektion des Lichts eines Spektralbereichs eines Lichtstrahls (1) in einem konfokalen Rastermikroskop, mit einem Mittel (2) zur spektralen Zerlegung des Lichtstrahls (1), mit Mitteln (3) zum Selektieren eines vorgebaren spektralen Bereichs (4) und mit einer Detektionsvorrichtung (5), dadurch gekennzeichnet, dass zur Beeinflussung des zu detektierenden spektralen Bereichs (4, 18) der spektral zerlegte Lichtstrahl (19) und die Detektionsvorrichtung (5) relativ zueinander in ihrer Position veränderbar sind.
2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionsvorrichtung (5) nur einen Detektor (20) umfasst.
3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl (19) und der Detektionsvorrichtung (5) eine Veränderung der Anfangs- und/oder Endwellenlänge des spektral selektierten Bereichs (4) bewirkt.
4. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl (19) und der Detektionsvorrichtung (5) durch Drehen und/oder Verschieben mindestens eines im Strahlengang (15) angeordneten optischen Bauteils, vorzugsweise eines Spiegels (21), erfolgt.
5. Anordnung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil (21) vor dem Mittel (2)

zur spektralen Zerlegung angeordnet ist.

6. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl (19) und der Detektionsvorrichtung (5) durch Drehen und/ oder Verschieben des Mittels (2) zur spektralen Zerlegung erfolgt. 5

7. Anordnung nach Anspruch 4 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Drehung unter Verwendung eines Galvanometers erfolgt. 10

8. Anordnung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das zu drehende Bauteil (21, 2) direkt an dem Galvanometer, vorzugsweise auf dessen mechanischer Drehachse befestigt, gekoppelt ist. 15

9. Anordnung nach Anspruch 4 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Drehung durch den Einsatz von Piezoelementen erfolgt. 15

10. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Piezoelement die Drehung über einen mechanischen Hebel bewirkt. 20

11. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl (19) und der Detektionsvorrichtung (5) durch eine Relativbewegung der Detektionsvorrichtung (5) erfolgt. 25

12. Anordnung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Relativbewegung der Detektionsvorrichtung (5) geradlinig oder auf einem Bogen verläuft.

13. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl (19) und der Detektionsvorrichtung (5) durch eine kombinierte Winkel-/Lageänderung mindestens zweier optischer Bauteile (21, 2, 5) erfolgt. 30

14. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Mittel (2) zur spektralen Zerlegung ein Prisma, ein Reflexions- oder ein Transmissionsgitter dient. 35

15. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die relative Positionsänderung zwischen dem spektral zerlegten Lichtstrahl (19) und der Detektionsvorrichtung (5) mit dem Rastervorgang des konfokalen Rastermikroskops synchronisierbar ist. 40

16. Anordnung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass mit dem konfokalen Rastermikroskop ein Objektausschnitt bei verschiedenen spektralen Detektionseinstellungen wiederholt solange jeweils abgerastert wird, bis der gesamte zu detektierende Spektralbereich detektiert ist, bevor ein nächster Objektausschnitt abgerastert wird. 45

17. Anordnung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Objektausschnitt ein Punkt, eine Linie, eine Gerade, eine Fläche oder ein dreidimensionaler Bereich ist. 55

18. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Synchronisation auch die Wahl der in das Rastermikroskop einzukoppelnden Lichtwellenlänge umfasst.

19. Anordnung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Wahl der einzukoppelnden Lichtwellenlänge mit einem akustooptischen Bauteil, insbesondere einem AOTF (8) (Acousto-Optical-Tunable-Filter) oder einem AOBS (Acousto-Optical-Beam-Splitter) erfolgt. 60

65

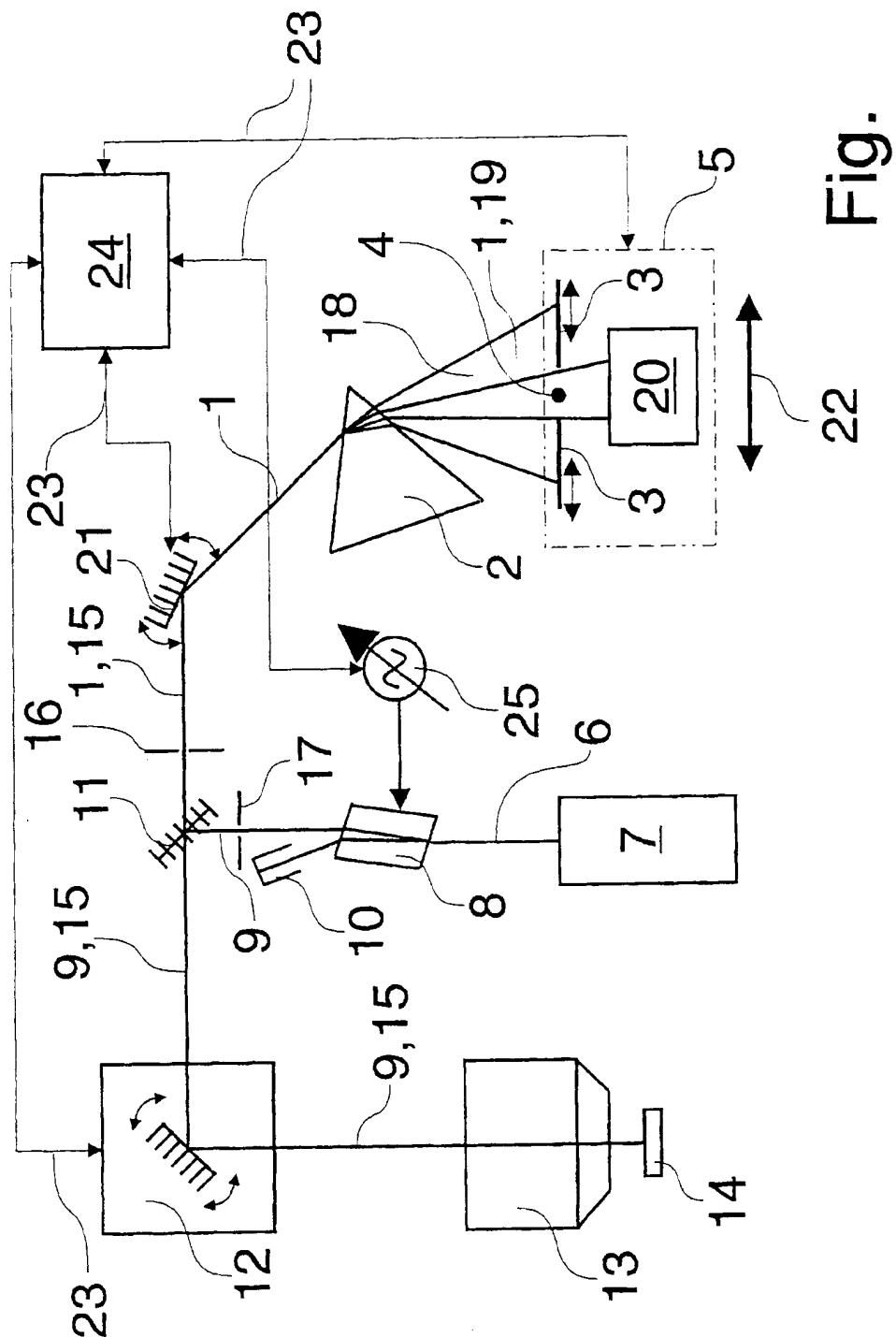


Fig.

